22

Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg.
2004, 10(2): 175-177

AZOKSİMETANLA KOLONİK ANORMAL KRİPT OLUŞTURULMUŞ FARELERDE VİTAMİN C'NİN ASPARTAT AMİNOTRANSFERAZ (AST) ve ALANİN AMİNOTRANSFERAZ (ALT) AKTİVİTELERİ ÜZERİNE ETKİSİ[1]

Sena ÇENESİZ* A. Kadir DEVRİM* Necati KAYA* Ayla ÖZCAN* Mahmut SÖZMEN**

Yayın Kodu: 2004/49-A

Özet: Bu çalışmada azoksimetanla kolonik anormal kript formasyonu oluşturulan farelerde vitamin C'nin serum ve karaciğer dokusundaki AST ve ALT aktiviteleri üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Materyal olarak ortalama 31.49 g ağırlıkta, 30 adet 12 haftalık Swiss Albino türü fare kullanıldı. Fareler üç gruba ayrıldı. 1. Grup kontrol, 2. Grup azoksimetan, 3. Grup ise azoksimetan+vitamin C verilen grubu oluşturdu. Tüm gruplara deneme boyunca kuru pelet yem ve su *ad libitum* olarak verildi. İkinci ve 3 Grup hayvanlara haftada 2 gün 7 hafta boyunca 5 mg/kg azoksimetan, 3. Gruba ise 500 mg/kg vitamin C her gün derialtına enjekte edildi. Enjeksiyonların ardından 6 haftalık bekleme süresinin sonunda hayvanlardan kan ve karaciğer doku örnekleri alındı. Yapılan analizler sonucunda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında serum AST aktivitesinde azoksimetan grubunda artış ($p<0.001$) görülürken, azoksimetan+vitamin C grubunda istatistiki anlamda bir fark görülmedi. Serum ALT aktivitesinde ise istatistiki anlamda önemli bir değişikliğe rastlanmadı.

Karaciğer dokusu AST aktivitesinde istatistiksel olarak önemli bir değişiklik görülmezken, kontrol grubuna göre ALT aktivitesinde; azoksimetan+vitamin C grubunda ($p<0.05$) ve azoksimetan grubunda ($p<0.001$) artışlar tespit edildi.

Yapılan bu çalışma sonucunda antikarsinojen olarak kullanılan vitamin C'nin kolon kanserinin gelişim süreci olan anormal kript oluşum dönemi boyunca alınması durumunda karaciğer hasarının önemli göstergesi olan AST ve ALT aktiviteleri üzerine etkisi incelendi ve vitamin C grubunda serum AST ile karaciğer doku ALT aktivitesinde olumlu etkisinin olduğu tespit edildi.

Anahtar sözcükler: Azoksimetan, kolonik anormal kript formasyonu, AST, ALT, fare, vitamin C.

Effect of Vitamin C Supplementation on the Aspartate Aminotransferase (AST) and Alanine Aminotransferase (ALT) Activities of Mice which was Induced Colonic Aberrant Crypt Foci Formation by Azoxymethane

Summary: In this study we investigated the effect of vitamin C on AST and ALT activities in the sera and liver tissues of the mice which have colonic abnormal crypt formation formed by azoxymethane.

30 Swiss Albino mice which are on avarage 12 weeks old and 31.49 g weight were used in this study. The mice were seperated into 3 groups. First Group was the control group. We applied azoxymethane to the Second Group and azoxymethane+vitamin C to the Third Group. Mice were fed *ad libitum* by dry grain feed and drunk water during the experiment period. During 7 weeks and two times a week, 5 mg/kg azoxymethane were injected SC to the Second and Third Groups and 500 mg/kg vitamin C were injected SC to the Third Group. At the end of the experiment we got the sera and liver tissue samples from all of the groups. In the sera AST activities, we observed increases in the Second Group when compared with First Group ($p<0.001$). Although, statistically we did not observed any alterations in the Third Group. Additionally in the sera ALT activities, we did not observed any alterations in the Second and Third Groups when compared with First Group. AST activities in the liver tissue did not show any alterations statistically. On the contrary, in ALT activities in the liver tissues we observed an increase in the Third Group ($p<0.05$) and a major increase in the Second gGroup ($p<0.001$).

Consequently, it is observed that application of vitamin C which is used as an anticancerogen, in the abnormal crypt formation which is the development period of colon cancer has a positive effect on AST and ALT activities which are important markers of the hepatic damage.

Keywords: Azoxymethane, colonic aberrant crypt formation, AST, ALT, mice, vitamin C.

GİRİŞ

Kanserin oluşum süreci belirli basamaklarda gelişen, ancak tam olarak anlaşılamamış olaylar dizisi olarak ifade edilmektedir. Bu basamakların ilki başlangıç basamağı olup, kanserojen madde hücre DNA dizisinde değişime neden olur. Bu basamak muhtemelen, kanserojeni üreten belirli bir prekürsörün metabolik aktivasyonundan sonra gelişmektedir.Günümüzde bir tümörün oluşması için bir dizi mutasyonun oluşması gerektiği düşünülmektedir. Başlangıç basamağını takip eden basmaklar daha az bilinmekle birlikte sinyal iletim yollarında değişikliğe yol açtıkları düşünülmektedir. Başlangıç sonrası basamaklardan daha net olarak anlaşılmış olanı ise anormal kriptlerin ortaya çıkmasıdır ki morfolojik olarak da gözlenebilen kolonik kriptlerdeki aşırı büyüme basmağıdır. Preneoplastik yapılar olarak değerlendirilen anormal kriptler normal kriptlerin, uzunluğu ve genişliği artmış şekilleridir. Anormal kriptler tek bir odakta tek veya gruplar halinde ortaya

1 Çalışma Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Deney Hayvanları ve Etik Kurulunun 07.01.2004 tarih ve 07 sayılı onayıyla yapılmıştır.

* Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Kars-TÜRKİYE
** Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, Kars-TÜRKİYE

çıkabilir. Bu anormal kriptlerin oran olarak küçük bir kısmı poliplere ve polipler de daha sonra tümör haline dönüşmektedir[1].

Vitamin C, önemli bir antioksidan olup, antikarsinojenik etkisini muhtemelen DNA'yı hasara uğratabilen reaktif oksijen türlerini ve diğer serbest radikalleri etkisiz hale getirerek gösterdiği ileri sürülmektedir[2]. Vitamin C'nin kriptik hücre proliferasyonunu azaltarak veya polip formasyonunu azaltarak etki ettiği de bildirilmektedir[3].

Enzimler; hayatın devamını sağlayan bir çok biyokimyasal reaksiyonun oluşmasına neden olan yaşamsal faktörlerdir. Bu sebeple enzim aktivite değişiklikleri organizmanın sağlık durumunu yansıtmaktadır[4]. Karaciğer, metabolizmanın merkezi kontrol organıdır ve karaciğerin metabolik aktivitesi ölçülerek, fonksiyonel durum hakkında bilgi edinilebilir. AST ve ALT karaciğer için spesifik enzimler olup, akut karaciğer hastalıklarında hücre zarının yıkımı ve hücre nekrozu sonucu plazmadaki aktiviteleri artmaktadır[5-7].

Bu çalışmada, önemli bir antikarsinojen olan vitamin C'nin kolon kanserinin gelişim dönemi boyunca (anormal kriptlerin oluşum süresince) uygulanması durumunda karaciğer hasarının önemli belirteçleri olan AST ve ALT aktivitelerini nasıl etkilediği araştırılmıştır.

MATERYAL ve METOT

Çalışmanın hayvan materyalini; 12 haftalık ve ortalama 31.49 g ağırlığında olan 30 adet Swiss Albino türü laboratuvar faresi oluşturdu. Fareler, her bir grupta 10 adet olmak üzere üç gruba ayrıldı. 1. Grup kontrol, 2. Grup azoksimetan, 3. Grup ise azoksimetan ve vitamin C verilen grubu oluşturdu. Tüm deneme boyunca, *ad libitum* olarak içme suyu ve kuru pelet yem verilen hayvanlar 7 haftalık deneme ve 6 haftalık bekleme süresince, 24±2 °C'lik oda ısısındaki ortamda barındırıldı.

Kontrol grubuna hiçbir uygulama yapılmadı. İki ve 3. grup hayvanlara haftada 2 gün, 7 hafta boyunca 5mg/kg azoksimetan (Sigma, St, Lousis Montana, USA)[8] ve ayrıca 3. gruba 500 mg/kg askorbik asit[9] günlük olarak derialtına enjekte edildi. Denemenin sonunda hayvanların kuyruklarından kan alındı ve serumları çıkartıldı. Daha sonra hayvanlara eter anestezisi altında ötenazi uygulandı. Nekropsisi yapılan hayvanların kolon ve karaciğerleri çıkarılarak serum fizyolojik ile yıkandı. Yıkama işleminin ardından tartılan karaciğerler, hem patolojik muayenelerinin yapılabilmesi hem de enzim aktivitelerinin tayini için iki parçaya bölündü. Patolojik muayene için rutin olarak hazırlanan parafin bloklardan 5 mikron kalınlığında alınan kesitler Hematoksilen-Eozin (HE) ile boyanarak ışık mikroskobunda incelendi.

Biyokimyasal analizlerin gerçekleştirilmesi amacıyla küçük parçalara ayrılan karaciğer dokusu daha sonra fosfat tamponu ilave edilerek homojenize edildi. Serumlar ve doku homojenatlarındaki AST ve ALT aktivitesi Reitman-Frankel metodu ile ölçüldü[10].

BULGULAR

Kolonda yapılan patolojik muayenede azoksimetan grubunda daha fazla sayıda kript ve daha bazofilik boyanmaları ile karakterize olan, hafif bir hiperplazi tablosuna da rastlandı.

Azoksimetan verilen gruba ait karaciğerlerde en karakteristik lezyon etkenin antimitotik etkisinden kaynaklanan ve hepatositlerin sitoplazma ve özellikle çekirdeklerinde gözlenen jigantizmdi (megalositozis). Çekirdeklerin içinde bir ya da iki adet asidofilik inklüzyon cisimciği tespit edildi. İki çekirdekli hepatositlerde ise artış tespit edildi. Büyüyen hücrelerin baskısıyla sinüzoidlerde kapanma gözlendi.

Vitamin C grubunda gözlenen değişiklikler azoksimetan grubuna benzer özellikler taşımakla beraber lezyonların şiddeti daha azdı.

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında serum AST aktivitesinde azoksimetan grubunda artış ($p<0.001$) görülürken, azoksimetan+vitamin C grubunda istatistiki anlamda bir fark görülmedi. Serum ALT aktivitesinde ise her iki grupta da istastistiki anlamda bir fark görülmedi.

Karaciğer doku AST aktivitesinde istatistiki olarak bir değişiklik görülmezken, ALT aktivitesinde kontrol grubuna göre azoksimetan+vitamin C ($p<0.05$) ve azoksimetan ($p<0.001$) gruplarında istatistiksel olarak anlamlı artışlar tespit edildi. Aynı zamanda azoksimetan ile azoksimetan+vitamin C grupları arasında da istatistiki bir anlamda bir farklılık vardı ($p<0.05$).

Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg.
2004, 10(2): 175-177

Tablo 1. Fare serum ve karaciğer dokusunda AST ve ALT aktiviteleri.
Table 1. AST and ALT activities of the sera and the liver tissues of mice.

GRUPLAR	Serum (IU/L)		Karaciğer (IU/g doku)	
	AST	ALT	AST	ALT
Kontrol (n=10)	18.9±4.4	10.2±7.5	49.1±3.3	83.4±4.2[a]
Azoksimetan (n=10)	22.8±5.3	11.2±8.4	58.4±4.3	115.8±1.7[b]
Azoksimetan+Vit C (n=10)	20.1±5.5	10.9±7.4	44.8±3.8	98.7±4.6[c]

*Aynı sütun içerisinde farklı harfler istatistiksel olarak anlamlı (Significant difference between the means in the same column).

TARTIŞMA ve SONUÇ

Kanserojen maddenin hücre DNA'sını bozması kolon kanserinin gelişimindeki ilk adımı teşkil etmektedir. Bu dönemi takiben, mutasyonlar oluşur ve bu mutasyonlar sonucunda da tümör hücresi oluşumu başlar. İkinci adım ise kolonda anormal kriptlerin oluşmasıdır. Kolonda görülen anormal kriptlerin izlenmesi ile de artık kolon kanserinin gelişiminin başladığı anlaşılabilmektedir[1].

Vitamin C'nin kanser riskini düşürdüğünü bildiren birçok araştırma yapılmıştır[4,11]. Cameron ve Pauling[12] yaptıkları bir çalışmada yüksek doz vitamin C verilen kanser hastalarının verilmeyenlere göre daha uzun yaşadıklarını ve vitamin C'nin kanser tedavisinde kullanılabileceğini belirtmiştir. Araştırmacı vitamin C'nin bu etkisinin kansere karşı vücut direncini artırmasından ileri geldiğini öne sürmüştür. Jacobs ve ark.[2] 10 yıl ve daha fazla süre ile Vitamin C kullanımının insanlarda kanser riskini düşürdüğünü bildirmiştir.

Kolon kanserinde DNA hasarı ve mutasyonların şekillenmesinde serbest radikallerin etkisi büyüktür. Vitamin C de en önemli antioksidanlardan biri olup serbest radikallere karşı rol oynamaktadır. Vitamin C karsinojenik nitrozaminlerin oluşumunu engelleyerek *in vitro* malignant transformasyonu önleyebilmekte ve hücredeki kromozom hasarını azaltmaktadır[13].

Birçok biyokimyasal reaksiyonun oluşması ve böylece yaşamın devamının sağlanması enzimler sayesinde olmaktadır. Bu sebeple enzim aktivitelerinde ortaya çıkan değişiklikler değerlendirilerek organizmanın sağlık durumu yansıtılabilmektedir[4]. Karaciğer, metabolizmanın merkezi kontrol organı olduğundan karaciğerin metabolik aktivitesi ölçülerek, fonksiyonel durum hakkında bilgi edinilebilir. AST ve ALT karaciğer için spesifik enzimler olup, akut karaciğer hastalıklarında hücre zarının yıkımı ve hücre nekrozu sonucu plazmadaki aktiviteleri artmaktadır[5-7].

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında serum AST aktivitesinde azoksimetan grubunda artış ($p<0.001$) görülürken, azoksimetan+vitamin C grubunda ve ALT aktivitesinde ise her iki grupta da istatistiki anlamda bir fark görülmedi. Karaciğer dokusu AST aktivitesinde istatistiki olarak bir değişiklik görülmezken, ALT aktivitesinde kontrol grubuna göre azoksimetan+vitamin C grubunda ($p<0.05$) ve azoksimetan grubunda ($p<0.001$) anlamlı artışlar tespit edildi.

Sonuçta antikarsinojenik olarak kullanılan vitamin C'nin kolon kanserinin gelişim süreci olan anormal kript oluşum dönemi boyunca alınması durumunda kolonda anormal kript oluşumunun azaldığı, karaciğer hasarının önemli göstergesi olan AST ve ALT aktiviteleri üzerinde ise serum AST ile karaciğer doku ALT aktivitelerinde azoksimetan grubuna göre azoksimetan+vitamin C grubunda azalmalar olduğu tespit edildi.

KAYNAKLAR

1 **Brady LJ, Gallaher DD, Busta FF:** The role of probiotic cultures in the prevention of colon cancer. *J Nutr*, 130:410-414, 2000.

2 **Jacobs EJ, Conell CJ, Patel AV, Chao A, Rodriguez C, Seymour J, McCullough ML, Calle EE, Thun MJ:** Vitamin C and vitamin E supplement use and colorectal cancer mortality in a large American cancer society cohort. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 10:17-23, 2001.

3 **Langman M, Boyle P:** Chemoprevention of cancer. *Gut*, 43:578-585, 1998.

4 **Kuchmar JF, Moss DW:** Fundamentals of Clinical Chemistry. Enzymes (Nobert W.T.) WB Saunders Company. Philadelphia, 562-698,1982.

5 **Cornellus CE:** Liver function. In, Kaneko JJ (Ed): Clinical Biochemistry of Domestic Animals. 3rd ed. New York, London, Academic Press, 230-242, 1980.

6 **Whitby LG, Percy-Robb IW, Smith AT:** Enzyme test in diagnosis. Blackwell Sci Pub, 138-69, 1984.

7 **Kuchel PW, Ralston GB:** Schaum's outline of theory and problems of biochemistry. McGraw-Hill Inc, 411-49, 1988.

8 **Chung H, Wu D, Han SN, Gay R, Goldin B, Bronson RE, Mason JB, Smith DE, Meydani SN:** Vitamin E supplementation does not alter azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci formation in young or old mice. *J Nutr*, 133:528-532, 2003.

9 **Koul A, Mishra A, Nehru B:** Modulation of oxidative stress by ascorbic acid and/or a-tocopherol. *J Nutr&Envir Med*, 10, 233-238, 2000.

10 **Richterich R:** Clinical Chemistry. Theory and Practice. S. Kargel, Basel (Switzerland). Academy Press, 321- 431. 1969.

11 **Byers T, Nestle M, McTiernan A, Doyle C, Currie-Williams A, Gangsler T, Thun M:** *CA Cancer J Clin*, 52:92-119, 2002.

12 **Cameron E, Pauling L:** Supplemental ascorbate in the supportive treatment of cancer: prolongation of survival times in terminal human cancer. *Proc Natl Acad Sci*, 73: 3685–3689: 1976.

13 **Kakizoe T:** Chemoprevention of cancer-focusing on clinical trials. *Jpn J Clin Oncol*, 33(9) 421-442, 2003.

Yazışma adresi (Correspondence address)

Yrd.Doç.Dr. Sena ÇENESİZ
Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı, 36280-Kars, TÜRKİYE
Tel : +90 474 2426801-1163
Fax : +90 474 2426846
e-mail: scenesiz@kafkas.edu.tr